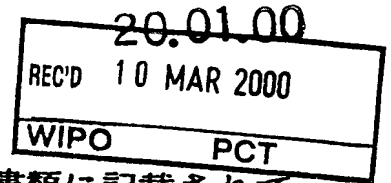


4 09/8897

PCT/JP00/00246

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



JPOO/246

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 1月20日

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第012434号

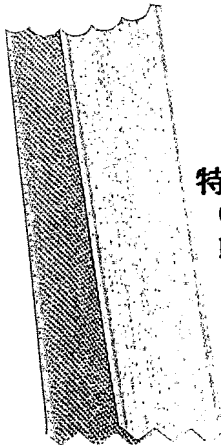
出 願 人
Applicant(s):

協和メデックス株式会社

PRIORITY
DOCUMENT

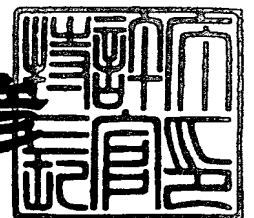
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 2月25日



特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3009537

【書類名】 特許願

【整理番号】 H10-191MH1

【提出日】 平成11年 1月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/28

C12Q 1/26

G01N 21/00

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 6 0 0 番 1 協和メ
デックス株式会社 協和メデックス研究所内

【氏名】 宮内 一人

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 6 0 0 番 1 協和メ
デックス株式会社 協和メデックス研究所内

【氏名】 高田 志津代

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 6 0 0 番 1 協和メ
デックス株式会社 協和メデックス研究所内

【氏名】 村上 智美

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 6 0 0 番 1 協和メ
デックス株式会社 協和メデックス研究所内

【氏名】 三池 彰

【特許出願人】

【識別番号】 000162478

【氏名又は名称】 協和メデックス株式会社

【代表者】 岡 徹夫

【代理人】

【識別番号】 100106574

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩橋 和幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008408

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9505337

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 リポ蛋白中のトリグリセライドの定量法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 特定のリポ蛋白中のトリグリセライド (TG) を含有する試料から遊離グリセロールを消去した後、得られた試料にリポプロテインリパーゼ (LPL)、および遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系を作用させ、発生する過酸化水素を定量することを特徴とする特定のリポ蛋白中の TG の定量法。

【請求項 2】 遊離グリセロールを消去する方法が、遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系により過酸化水素を発生させ、次いで該過酸化水素を除去する方法である請求項 1 記載の特定のリポ蛋白中の TG の定量法。

【請求項 3】 発生する過酸化水素を定量する際に特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬を存在させることを特徴とする請求項 2 記載の特定のリポ蛋白中の TG の定量法。

【請求項 4】 特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬が特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する界面活性剤および／または特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の凝集剤である請求項 3 記載の特定のリポ蛋白中の TG の定量法。

【請求項 5】 特定のリポ蛋白が高密度リポ蛋白 (HDL) であり、特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する界面活性剤がポリオキシエチレングリコール誘導体で低泡性湿潤浸透剤である請求項 4 記載の特定のリポ蛋白中の TG の定量法。

【請求項 6】 特定のリポ蛋白が高密度リポ蛋白 (HDL) であり、特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の凝集剤がポリアニオンと 2 価の金属塩の組合せである請求項 4 記載の特定のリポ蛋白中の TG の定量法。

【請求項 7】 遊離グリセロールを消去後に、特定のリポ蛋白の反応を可能にする界面活性剤および／または酵素を添加することを特徴とする請求項 2 記載の特定のリポ蛋白中の TG の定量法。

【請求項 8】 遊離グリセロールを消去する際に、特定のリポ蛋白以外のリ

が蛋白中のTGも除去することを特徴とする請求項1記載の特定のリポ蛋白中のTGの定量法。

【請求項9】 遊離グリセロールおよび特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白中のTGを消去する方法が、特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる試薬の存在下にLPL、および遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系により過酸化水素を発生させ、次いで該過酸化水素を除去する方法である請求項8記載の特定のリポ蛋白中のTGの定量法。

【請求項10】 特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる試薬が、特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる界面活性剤および／または特定のリポ蛋白の凝集剤である請求項9記載の特定のリポ蛋白中のTGの定量法。

【請求項11】 遊離グリセロールおよび特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白中のTGを消去後に、特定のリポ蛋白の反応を可能にする界面活性剤および／または酵素を添加することを特徴とする請求項10記載の特定のリポ蛋白中のTGの定量法。

【請求項12】 特定のリポ蛋白が低密度リポ蛋白(LDL)であり、過酸化水素を除去する段階に用いる特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる界面活性剤がポリオキシエチレングリコールアルキルフェニルエーテル(HLB15以上)、またはポリオキシエチレングリコール誘導体で低泡性湿潤浸透剤である請求項10または11記載の特定のリポ蛋白中のTGの定量法。

【請求項13】 遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系が、グリセロールキナーゼ(GK)とグリセロール3-リン酸オキシダーゼ(GPO)を含有する系である請求項1～12記載の特定のリポ蛋白中のTGの定量法。

【請求項14】 遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系が、グリセロールオキシダーゼ(GO)を含有する系である請求項1～12記載の特定のリポ蛋白中のTGの定量法。

【請求項15】 過酸化水素を定量する方法が、過酸化水素にパーオキシダーゼ(POD)と色素源を作用させて色素を生成させ、該色素を吸光度的に定量する方法である請求項1～14記載の特定のリポ蛋白中のTGの定量法。

【請求項16】 色素源が4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬の組み

合わせである請求項 1 5 記載の特定のリポ蛋白中の T G の定量法。

【請求項 1 7】 過酸化水素を除去する方法が、過酸化水素に P O D と色素源を作用させて色素を生成させ、該色素を酵素的に除去する方法である請求項 1 ～ 1 6 記載の特定のリポ蛋白中の T G の定量法。

【請求項 1 8】 リポ蛋白中の T G を含有する試料が血清または血漿検体である請求項 1 ～ 1 7 記載の特定のリポ蛋白中の T G の定量法。

【請求項 1 9】 特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬、L P L、G K、G P O および P O D を含有する特定のリポ蛋白中の T G の定量試薬。

【請求項 2 0】 特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬、L P L、G O および P O D を含有する特定のリポ蛋白中の T G の定量試薬。

【請求項 2 1】 特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる試薬、L P L、G K、G P O および P O D を含有する特定のリポ蛋白中の T G の定量試薬。

【請求項 2 2】 特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる試薬、L P L、G O および P O D を含有する特定のリポ蛋白中の T G の定量試薬。

【請求項 2 3】 特定のリポ蛋白の反応を可能にする界面活性剤および／または酵素を含有する請求項 2 1 または 2 2 記載の特定のリポ蛋白中の T G の定量試薬。

【請求項 2 4】 最終反応液において特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬もしくは特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる試薬、L P L、G K、G P O および P O D を含有する特定のリポ蛋白中の T G の定量試薬。

【請求項 2 5】 最終反応液において特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬もしくは特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる試薬、L P L、G O および P O D を含有する特定のリポ蛋白中の T G の定量試薬。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床検査分野で特に動脈硬化症の危険因子として意義のある脂質中のトリグリセライド (T G) の定量法に関する。

【0002】

【従来の技術】

現在、臨床検査分野では、高密度リポ蛋白（HDL）中のコレステロールは動脈硬化症の危険因子として負の因子、低密度リポ蛋白（LDL）中のコレステロールは正の因子とされており、頻繁に定量されている。また、虚血性心疾患を主体とする動脈硬化性疾患の発現には、高脂血症が大きな要因であることが多くの疫学的な調査によって明確にされてきた。また、超低密度リポ蛋白（VLDL）のアポE蛋白の中で、E1はレセプターによって取り込まれるが、III型高脂血症に関係のあるE2は取り込まれない[動脈硬化, 25(11・12), 415-420 (1998)、医学のあゆみ, 172(5), 276-280 (1995)]。このように、現在までに、リポ蛋白については、動脈硬化の危険因子として種々の面から取り上げられてきた。

【0003】

さらに、近年、リポ蛋白中に含まれる脂質の種類および量の違いが種々の疾患に関与していると言われている。その中で、家族性高脂血症に関しては、LDLの中でも特にスモールデンス（小型高密度）LDLが、関連の深い動脈硬化の正の因子であるとの報告もある。スモールデンスLDLは、VLDLからTGの異化酵素の作用によって生じるLDLであり、スモールデンスLDL中では、通常のLDL中と比較した場合、TG含量とコレステロール含量の比が変化しており、TG含量の割合が高くなっている[医学のあゆみ, 164(12), 833-836 (1993)]。従って、LDL中のTG濃度が高いとき（スモールデンスLDLの指標となる）、動脈硬化になる危険率が高くなると考えられている。

【0004】

各リポ蛋白中のTGを特異的に定量する方法としては、例えば超遠心により各リポ蛋白を分画分取し、その中に含まれるTGを例えばリポプロテインリパーゼ（LPL）、グリセロールキナーゼ（GK）、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ（GPO）からなる酵素系で処理することにより過酸化水素を発生させ、次いで生じた過酸化水素とパーオキシダーゼ（POD）により色素源を発色させて比色定量する方法等が考えられるが、これらの方法では、超遠心に時間や手間がかかり、非常に煩雑である。

【0 0 0 5】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、種々のリポ蛋白中のTGを簡便に定量する方法を提供することにある。

【0 0 0 6】

【課題を解決するための手段】

血清、血漿検体等には、遊離グリセロールや、種々のリポ蛋白中のTGが存在する。本発明は、これら種々のリポ蛋白の中で特定のリポ蛋白中に存在するTGを特異的に定量しようとするものである。このため、定量に影響する遊離グリセロールは何らかの形で反応しないものに変化させる必要がある他、特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白中のTGを反応に関与しないものにあらかじめ変化させるか、または反応させないように阻害させることが必要である。

【0 0 0 7】

本発明は、特定のリポ蛋白中のTGを含有する試料から遊離グリセロールを消去した後、得られた試料にLPL、および遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系を作用させ、発生する過酸化水素を定量することを特徴とする特定のリポ蛋白中のTGの定量法に関する。

一つの形態としては、遊離グリセロールを消去する方法が、遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系により過酸化水素を発生させ、次いで該過酸化水素を除去する方法であるものがあげられ、発生する過酸化水素を定量する際に特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬を存在させることができる。特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬としては、特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する界面活性剤および／または特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の凝集剤等があげられる。また、発生する過酸化水素を定量する際に特定のリポ蛋白の反応を可能にする界面活性剤および／または酵素を存在させることもできる。

【0 0 0 8】

別の形態においては、遊離グリセロールを消去する際に、特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白中のTGを除去することもできる。例えば、特定のリポ蛋白以外のリ

ポ蛋白を反応させる試薬の存在下に、LPL、および遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系により過酸化水素を発生させ、次いで該過酸化水素を除去することができる。特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる試薬としては、特定のリポ蛋白の反応を阻害する界面活性剤および／または特定のリポ蛋白の凝集剤等があげられる。また、遊離グリセロールおよび特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白中のTGを消去後に、特定のリポ蛋白の反応を可能にする界面活性剤および／または酵素を添加することもできる。

【0009】

遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系としては、GKとGPOを含有する系、あるいはグリセロールオキシダーゼ(GO)を含有する系が好ましい。

また、本発明により、特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬もしくは特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる試薬、LPL、GK、GPOおよびPODを含有する特定のリポ蛋白中のTGの定量試薬、あるいは特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬もしくは特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる試薬、LPL、GOおよびPODを含有する特定のリポ蛋白中のTGの定量試薬を提供することができる。特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる試薬を含有する場合、さらに、特定のリポ蛋白の反応を可能にする界面活性剤および／または酵素を含有させることができる。

【0010】

また、本発明により、最終反応液において特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬もしくは特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる試薬、LPL、GK、GPOおよびPODを含有する特定のリポ蛋白中のTGの定量試薬、あるいは最終反応液において特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬もしくは特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白を反応させる試薬、LPL、GOおよびPODを含有する特定のリポ蛋白中のTGの定量試薬を提供することができる。

【0011】

前記したそれぞれの定量試薬においては、成分により2つ以上の試薬に分かれ

たキット形態のものも含まれる。

なお、特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害するとは、特定のリポ蛋白中のTGを選択的に酵素反応を受け得る状態にならしめることをいう。また、特定のリポ蛋白の反応を可能にするとは、特定のリポ蛋白中のTGを酵素反応を受け得る状態にならしめることをいう。

【0012】

【発明の実施の形態】

リポ蛋白中のTGを含有する試料としては、血清、血漿等の検体があげられる。

例えば、HDL中のTGの定量は、まず、HDL以外のリポ蛋白の凝集剤、HDL以外のリポ蛋白の反応を阻害する界面活性剤等のHDL以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬の存在下で、一旦遊離グリセロールを基質としてGKおよびGPOの作用により（またはGOの作用により）過酸化水素を発生させ、生じた過酸化水素を酵素的に、例えばカタラーゼ、またはカップリング型色素源の一方とパーオキシダーゼで除去し、次いでLPL、またはHDL以外のリポ蛋白の反応を阻害する界面活性剤とLPL、およびカップリング型色素源の他方を添加反応させ、生成した色素を定量することにより、行うことができる。HDL以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬は、遊離グリセロールを酵素処理して生じた過酸化水素を除去した後に添加することもできる。

【0013】

HDL以外のリポ蛋白の凝集剤としては、ポリアニオンと2価の金属塩の組合せ、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる抗体、ポリオキシエチレングリコール（PEG）等があげられる。ポリアニオンとしては、ヘパリンもしくはその塩、リントングステン酸もしくはその塩、デキストラン硫酸もしくはその塩、硫酸化シクロデキストリンもしくはその塩、硫酸化オリゴ糖もしくはその塩等があげられ、シクロデキストリンとしては、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン等があげられ、オリゴ糖としては、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース等があげられ、塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム

塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩等があげられる。2価の金属塩としては、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩、コバルト塩等があげられ、中でもマグネシウム塩が好ましい。

【0014】

ポリアニオンは、0.1 g/L～50 g/Lで使用されるのが好ましい。例えば、0.02～10 mMの分子量5000～20000のヘパリンもしくはその塩、0.1～10 mMの分子量4000～8000のリンタングステン酸もしくはその塩、0.01～5 mMの分子量10000～500000のデキストラン硫酸もしくはその塩、0.1～20 mMの分子量1000～10000のデキストラン硫酸もしくはその塩、0.1～50 mMの分子量1000～3000の硫酸化シクロデキストリンもしくはその塩、0.1～50 mMの分子量400～3000の硫酸化オリゴ糖もしくはその塩またはそれらの混合物等が好ましく用いられる。さらに好ましくは、0.03～1 mMの分子量14000～16000のヘパリンもしくはその塩、0.1～3 mMの分子量5000～7000のリンタングステン酸もしくはその塩、0.01～5 mMの分子量150000～250000のデキストラン硫酸もしくはその塩、0.1～10 mMの分子量1000～5000のデキストラン硫酸もしくはその塩、0.1～10 mMの分子量1000～2000の硫酸化シクロデキストリンもしくはその塩、0.1～10 mMの分子量400～2000の硫酸化オリゴ糖もしくはその塩またはそれらの混合物等が用いられる。

【0015】

2価の金属塩としては、0.1～50 mMのマグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩、コバルト塩等が用いられ、好ましくは、0.1～50 mMのマグネシウム塩が用いられる。

HDL以外のリポ蛋白を凝集させる抗体としては、抗アポB抗体、抗アポC抗体等があげられる。抗アポB抗体、抗アポC抗体としては、人血清より精製したアポ蛋白Bまたはアポ蛋白Cを家兎に免疫して得られる抗アポB抗血清または抗アポC抗血清を硫酸沈殿、塩析して得られるIgG画分、あるいは上記アポ蛋白Bまたはアポ蛋白Cをマウスに免疫して得られる抗アポBモノクローナル抗体、

抗アポCモノクローナル抗体（単クローン抗体実験操作入門、安東民衛著、講談社サイエンティフィック、21頁、1991年）等があげられる。

【0016】

PEGとしては、0.3～100mMの分子量4000～25000のPEGが好ましく用いられ、さらに好ましくは、1.0～50mMの分子量5000～22000のPEGが用いられる。

HDL以外のリポ蛋白の反応を阻害する界面活性剤としては、ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテル、ポリオキシエチレングリコールアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレングリコール-ポリオキシプロピレングリコール縮合物〔プルロニックF-68、プルロニックF-88（旭電化）等〕、ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩等の特開平8-201393に示されている界面活性剤や、エマルゲン220、エマルゲン913、エマール20C、エマルゲンB-66等のポリオキシエチレングリコール誘導体で低泡性湿潤浸透剤と言われる界面活性剤、ドデシルベンゼンスルホン酸塩等のアニオン系界面活性剤、コール酸、デオキシコール酸等の胆汁酸系界面活性剤等があげられる。好ましくは、プルロニックF-68やプルロニックF-88（旭電化）等の類、エマルゲン220、エマルゲン913、エマール20C、エマルゲンB-66、ドデシルベンゼンスルホン酸塩等があげられる。界面活性剤の濃度としては、0.01～5%の範囲が好ましい。

【0017】

また、LDL中のTGの定量は、まず、LDL以外のリポ蛋白中のTGを、ポリオキシエチレングリコールアルキルフェニルエーテル〔HLB（界面活性剤の構造中の親油性部分と親水性部分のバランスの指標）15以上〕、ポリオキシエチレングリコール誘導体で低泡性湿潤浸透剤と言われる界面活性剤等のLDL以外のリポ蛋白を反応させる界面活性剤、またはこれら界面活性剤とLDL凝集剤〔ポリアニオン（2価の金属塩を含む場合もある）、LDLを凝集させる抗体等〕の組み合わせ等のLDL以外のリポ蛋白を反応させる試薬の存在下で、一旦遊離グリセロールと共にLPL、GKおよびGPOの作用により（またはLPLおよびGOの作用により）過酸化水素に導き、発生する過酸化水素を酵素的に、例

えばカタラーゼ、またはカップリング型色素源の一方とパーオキシダーゼで除去し、次いでLDLの反応を可能にする界面活性剤とカップリング型色素源の他方、あるいはこれら界面活性剤とLPLとカップリング型色素源の他方を添加することにより、行うことができる。

【0018】

LDL以外のリポ蛋白中のTGを消去する際に使用されるLDL以外のリポ蛋白を反応させる界面活性剤としては、前記HDL定量の例中に記載された界面活性剤の他、エマルゲンA-60等、HLBの比較的高い界面活性剤等があげられる。具体例には、前記界面活性剤の他、ノニオンNS-220、NS-230、NS-240、HS-220、HS-240等のポリオキシエチレングリコールアルキルフェニルエーテルがあげられ、これらはゴム・プラスチック乳化剤であり、HLBが15以上のものが多い。また、これらは混合物として用いることもできる。一般に、HLBには加成性があり、HLBの高いものと低いものを組み合わせることで適当なHLBに調整することも常識である。界面活性剤の濃度としては、0.01～5%の範囲が好ましい。

【0019】

LDL以外のリポ蛋白中のTGを消去する際に使用されるポリアニオン、2価の金属塩、LDLを凝集させる抗体としては、前記HDL定量の例中に記載されたポリアニオン、2価の金属塩、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる抗体等があげられる。

LDLの反応を可能にする界面活性剤としては、LDLを溶解する非イオン系界面活性剤、例えばエマルゲン709、トリトンX-100、トリトンDF-16、トリトンLO-5等が単独もしくは組み合わせて使用される。具体的には、トリトンDF-16（シグマ）、エマルゲン709（花王）等の可溶化能の高い界面活性剤があげられる。界面活性剤の濃度としては、0.01～5%の範囲が好ましい。

【0020】

酵素としては、通常市販されている、LPL、GK、GPO、GO、POD等があげられ、これら酵素の特異性、安定性をさらにあげるためにポリオキシエチ

レングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分とする基、水溶性のオリゴ糖残基等の構造に糖類を含む基、スルホプロピル基、ポリウレタン基等で上記の酵素を化学的に修飾したものも用いられる。また、遺伝子操作によってこれらの遺伝子を取り、別の微生物に導入して発現させた酵素またはこれらを化学的に修飾した修飾体、あるいはこれらの遺伝子を改変して発現させた酵素またはこれらを化学的に修飾した修飾体等も好適に用いられる。

【0021】

酵素を修飾するための試薬（化学修飾剤）としては、例えば、ポリオキシエチレングリコールにアミノ基と結合可能な基を結合させた化合物（ポリオキシエチレングリコールにN-ヒドロキシサクシンイミド基等のアミノ基と結合可能な基を結合させたサンブライトVFM4101〔日本油脂（株）製〕等）、ポリオキシアルキレングリコール構造および酸無水物構造を有するサンブライトAKMシリーズ、同ADMシリーズ、同ACMシリーズ〔いずれも日本油脂（株）製：化学工学論文集、第20巻、第3号、459頁、1994年〕、ポリオキシエチレングリコールとポリオキシプロピレングリコールの共重合体にアミノ基と結合可能な基を結合させた化合物、ポリオキシエチレングリコールモノメタクリルモノメチルエーテルと無水マレイン酸の共重合体等があげられる。また、ポリウレタンの化学修飾剤であるポリウレタンP4000activated（ベーリンガー・マンハイム社製 Enzyme modification set能書）、デキストランの化学修飾剤であるデキストランT40, TCT-activated（同）、1, 3-プロパンサルトン等も使用できる。これら化学修飾剤により、酵素を、ポリオキシエチレングリコールを主成分とする基、ポリオキシプロピレングリコールを主成分とする基、ポリオキシプロピレングリコールとポリオキシエチレングリコールの共重合体を有する基、構造に糖類を含む基、スルホプロピル基、ポリウレタン基等で修飾することができる。

【0022】

次に、酵素に上記化学修飾剤を反応させる方法を例示するが、本願発明は、これによって制約されない。まず、酵素をpH8以上のヘプス緩衝液等の緩衝液中に溶解し、0～50℃で例えば0.01～500倍モル量のサンブライトを添加

し、5～60分間攪拌する。この反応液をそのままあるいは必要に応じて限外濾過膜により低分子物を除去して用いる。

【0023】

LPLは0.1～20単位(U)/ml、GKは0.2～30U/ml、GPOは1～50U/ml、PODは1～100U/ml、GOは2～200U/mlで使用するのが好ましい。

過酸化水素を検出する色素源としては、4-アミノアンチピリンとフェノール、4-クロロフェノール、m-クレゾール、3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨード安息香酸(HTIB)等のフェノール類との組合せの他、4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬として知られている(同仁化学研究所第19版総合カタログ、1994年)N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン(TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン(TOPS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N,N-ジメチル-m-トルイジン、N,N-ジスルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシジン、N-エチル-N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン等のアニリン類あるいはN-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン、N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン、N-エチル-N-(2-ヒ

ドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン等との組み合わせ(カップリング型色素源)が好適である。また、10-(N-カルボキシメチルアミノカルボニル)-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン(MC DP)やビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン(BCMA)等も使用できる。これら色素源の濃度としては、0.02~2 g/Lが適当である。

【0024】

本発明においては、液に緩衝能をもたせる緩衝剤を使用することもできるが、該緩衝剤としては、リン酸塩、ホウ酸塩、有機酸塩等の他、グッド、トリスの緩衝剤等が好適に用いられ、濃度としては、10~200 mMが好適である。pHは5~9の範囲が好ましい。

次に、実施例を示す。

【0025】

【実施例】

実施例1 LDL中TGの測定

試薬1 (pH=6.25) 緩衝剤[ピペラジン-1, 4-ビス(2-エタン

ス	
ルホン酸) (PIPES)]	50mM
TOOS (同仁化学)	0.3g/L
アデノシン三リン酸 (ATP)・2ナトリウム塩 (和光純薬)	2.5g/L
アスコルビン酸オキシダーゼ (旭化成)	3kU/L
GK (東洋紡)	1kU/L
GPO (旭化成)	8kU/L
パーオキシダーゼ (東洋紡)	20kU/L
PEG修飾LPL (東洋紡)	1.5kU/L
LPL III (天野)	60kU/L
ノニオンNS-230 (日本油脂)	0.1%

	硫酸マグネシウム・7水和物（和光純薬）	0.5g/L
試薬2（pH=6.25）	緩衝剤（PIPES）	50mM
	エマルゲン709	0.6%
	トリトンDF-16	0.3%
	4-アミノアンチピリン（和光純薬）	0.5g/L

【0026】

日立7170型自動分析機を用い、下記のパラメーター条件でタイムコースをとり、特異性の確認を行った。検体としては、人血清より超遠心して分画されたHDL、LDLおよびVLDL画分を使用した。各リポ蛋白中のTGを総TG測定用試薬（協和メデックス）で測定した場合のタイムコースを第1図に示し、上記試薬で測定した場合のタイムコースを第2図に示す。総TG測定用試薬で処理した場合には、それぞれのリポ蛋白中のTG全てが反応するのに対して、上記試薬で処理した場合には、第一反応で検体中の遊離グリセロールおよびHDL、VLDL中のTGが先に反応して過酸化水素が発生し、該過酸化水素がカタラーゼによって同時に消去され、試薬2を添加した時点ではLDLのみの反応しか起こらず、特異的にLDL中のTGが定量される系が構築された。また、同じ日立7170形を使用して、下記のパラメータを入れて健常人血清検体を検体として分析を行った。標準液としては、上記分画LDLを使用し、その値としては、デタミナーL TG（協和メデックス社製）で測定された値を分析機のパラメータとして入れた。

【0027】

このようにして得られた分析値について、対照法としての下記の方法から得られる値との比較を行った所、相関係数0.918が得られた。

（対照法）米国CDCによって定められたHDL測定標準法に沿って各検体を超遠心して得られるHDL、LDL画分の総TGを定量し（TG（L+H））、定められた分画剤（ヘパリン-マンガン）を投入し、沈殿分離して得られたHDL分のTG（H）値との差〔TG（L+H）-TG（H）〕を使用した。

（パラメータ）

分析法：2ポイントエンド、

測光ポイント：16-34、範囲：10分

測定波長：546nm、副波長：700nm

検体量：3.2 μ l

試薬量 R1：240 μ l R2：80 μ l

【0028】

実施例2 HDL中TGの測定

試薬1 (pH=6.25)	緩衝剤 (PIPES)	50mM
	TOOS (同仁化学)	0.3g/L
	ATP・2ナトリウム塩 (和光純薬)	2.5g/L
	アスコルビン酸オキシダーゼ (旭化成)	3kU/L
	GK (東洋紡)	1kU/L
	GPO (旭化成)	8kU/L
	カタラーゼ (シグマ)	300kU/L
	デキストラン硫酸ナトリウム	0.2g/L
	硫酸マグネシウム・7水和物 (和光純薬)	0.5g/L
	試薬2 (pH=6.25)	緩衝剤 (PIPES) 50mM
	エマルゲンB-66 (花王)	20g/L
	塩化カルシウム・2水和物	0.1g/L
	4-アミノアンチピリン (和光純薬)	0.5g/L
	アジ化ナトリウム	0.5g/L
	LPL (旭化成)	1000kU/L
	パーオキシダーゼ (東洋紡)	20kU/L

【0029】

日立7170型自動分析機を用い、下記のパラメーター条件でタイムコースをとり、特異性の確認を行った。検体としては、人血清より超遠心して分画された実施例1と同じHDL、LDLおよびVLDL画分を使用した。第3図に示されるように、第一反応では試薬1で処理することにより遊離グリセロールが先に反応して過酸化水素が発生し、該過酸化水素がカタラーゼによって同時に消去され、試薬2を添加した時点ではHDLのみの反応しか起こらず、特異的にHDL中

のTGが定量される系が構築された。また、同じ日立7170形を使用して、健康人血清検体を検体として分析を行った。標準液としては、上記分画HDLを使用し、その値としては、デタミナーL TG（協和メデックス社製）で測定された値を分析機のパラメータとして入れた。

【0030】

このようにして得られた分析値について、対照法としての下記の方法から得られる値との比較を行った所、相関係数0.911が得られた。

（対照法）米国CDCによって定められたHDL測定標準法に沿って各検体を超遠心して得られるHDL、LDL画分に定められた分画剤（ヘパリン-マンガン）を投入し、沈殿分離して得られた上清中のHDL分のTG値を使用した。

（パラメータ）

分析法：2ポイントエンド、

測光ポイント：16-34、範囲：10分

測定波長：546nm、副波長：700nm

検体量：3.2μl

試薬量R1：240μl R2：80μl

【0031】

【発明の効果】

本発明により、種々のリポ蛋白中のTGを簡便に定量する方法が提供される。特に、LDL中のTGを定量することにより、スモールデンスLDLの生成量の指標が得られ、ひいては、動脈硬化予防につなげることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

HDL、LDLおよびVLDL画分を使用し総TG測定用試薬により測定された吸光度のタイムコースを示すものである。

【図2】

HDL、LDLおよびVLDL画分を使用し実施例1の方法により測定された吸光度のタイムコースを示すものである。

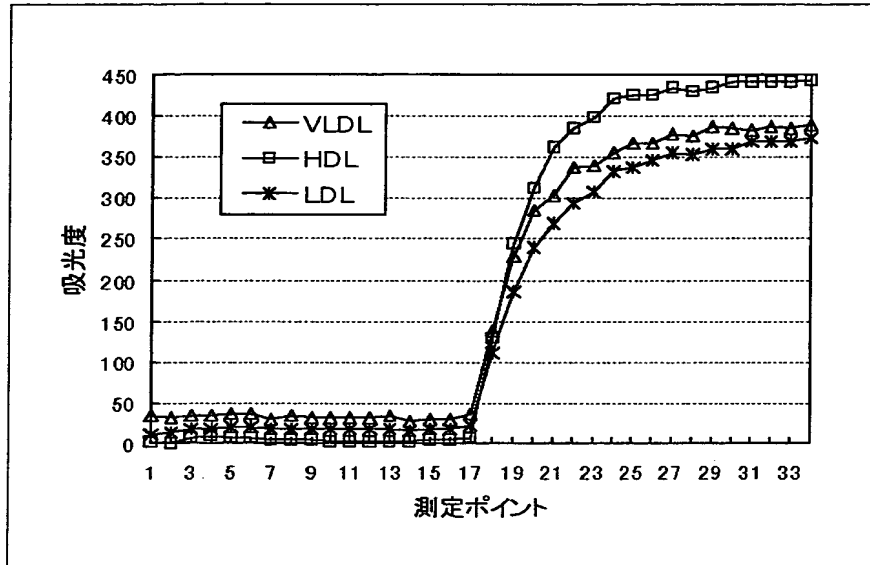
【図3】

HDL、LDLおよびVLDL画分を使用し実施例 2 の方法により測定された
吸光度のタイムコースを示すものである。

【書類名】 図面

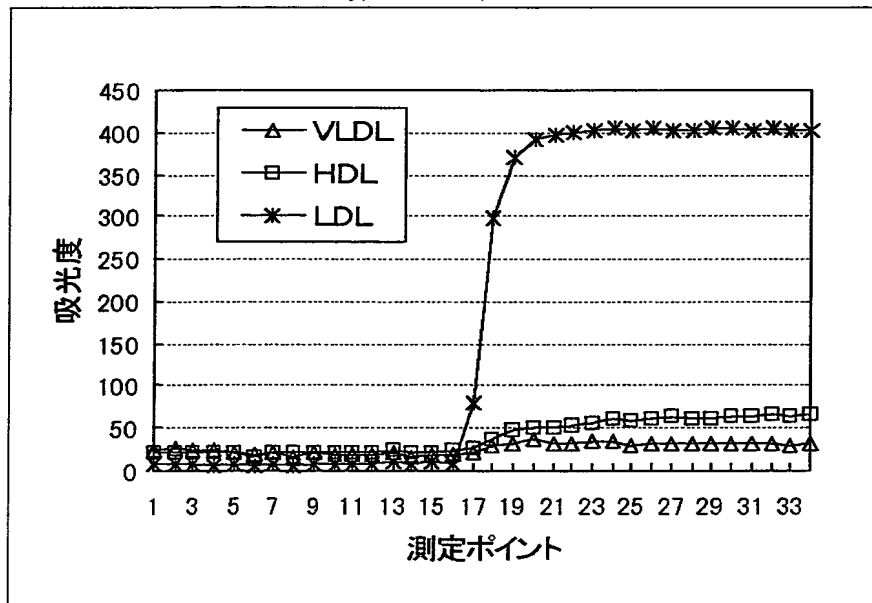
【図 1】

第 1 図



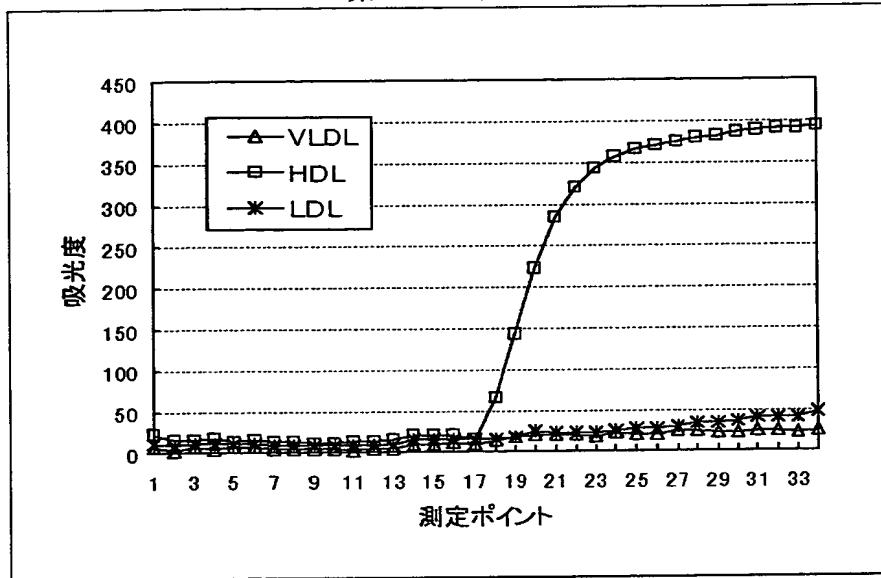
【図 2】

第 2 図



【図 3】

第 3 図



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 種々のリポ蛋白中のTGを簡便に定量する方法を提供すること。

【解決手段】 特定のリポ蛋白中のトリグリセライド(TG)を含有する試料から遊離グリセロールを消去した後、得られた試料にリポプロテインリパーゼ、および遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系を作用させ、発生する過酸化水素を定量することを特徴とする特定のリポ蛋白中のTGの定量法を提供する。

【選択図】 図 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000162478]

- | | |
|----------|-----------------|
| 1. 変更年月日 | 1994年 9月13日 |
| [変更理由] | 住所変更 |
| 住 所 | 東京都中央区入船二丁目1番1号 |
| 氏 名 | 協和メデックス株式会社 |